

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Vitaliy A. LIVSHITS, et al.

GAU:

SERIAL NO: New Application

EXAMINER:

FILED: Herewith

FOR: METHOD FOR PRODUCING L-AMINO ACID

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS  
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
RUSSIA	98124016	December 30, 1998
RUSSIA	99104431	March 9, 1999

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .  
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and  
(B) Application Serial No.(s)
  - ☐ are submitted herewith
  - ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.

**MARVIN J. SPIVAK**  
REGISTRATION NUMBER 24,913

Norman F. Oblon  
Registration No. 24,618

Fourth Floor  
1755 Jefferson Davis Highway  
Arlington, Virginia 22202  
Tel. (703) 413-3000  
Fax. (703) 413-2220  
(OSMMN 11/98)

#8  
PAT  
416-01  
Jc490 U.S. P10  
09/459573  
12/13/99



РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ  
(РОСПАТЕНТ)

**ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ПРОМЫШЛЕННОЙ СОБСТВЕННОСТИ**



рег. No 20/14-300

11 июня 1999 г.

### СПРАВКА

Федеральный институт промышленной собственности Российского Агентства по патентам и товарным знакам настоящим удостоверяет, что приложенные материалы являются точным воспроизведением первоначального описания, формулы и чертежей (если имеются) заявки на выдачу патента на изобретение N 98124016, поданной в декабре месяце 30 дня 1998 года.

**Название изобретения:** Фрагменты ДНК, определяющие повышенную устойчивость бактерий *Escherichia coli* к аминокислотам или их аналогам, и способ получения L-аминокислот.

**Заявитель (и):** Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов (ГНИИгенетика).

**Действительный автор(ы):** ЛИВШИЦ Виталий Аркадьевич, RU,  
ЗАКАТАЕВА Наталия Павловна, RU,  
НАКАНИШИ Казуо, JP,  
АЛЕШИН Владимир Вениаминович, RU,  
ТРОШИН Петр Владимирович, RU,  
ТОКМАКОВА Ирина Львовна, RU.



Уполномоченный заверить копию  
заявки на изобретение

Г.Ф.Востриков  
Заведующий отделом

ФРАГМЕНТЫ ДНК, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ПОВЫШЕННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ  
БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* К АМИНОКИСЛОТАМ ИЛИ ИХ АНАЛОГАМ, И  
СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ L-АМИНОКИСЛОТ

Настоящее изобретение относится к биотехнологии и, в частности, касается способа получения L-аминокислот, а именно, L-глутаминовой кислоты, L-лизина, L-треонина, L-аланина, L-гистидина, L-пролина, L-аргинина, L-валина, или L-изолейцина с помощью бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*.

Для получения аминокислот с помощью ферментации используются штаммы, выделенные из природных источников, или с целью увеличения продуктивности применяют специально полученные мутанты этих штаммов. В случае L-лизина, например, известно много искусственных мутантов, продуцирующих эту аминокислоту. Большинство из них – это мутанты бактерий, устойчивые к S-2-аминоэтилцистеину, (АЭЦ) принадлежащие к родам *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Bacillus* или *Escherichia*. Предложено много различных приемов для повышения продукции аминокислот, например, таких как трансформация рекомбинантными ДНК (Патент США 4,278,765). Эти приемы в большинстве случаев основаны на повышении активности ферментов, участвующих в биосинтезе аминокислоты, в придании ключевому ферменту нечувствительности к ингибирующему действию конечного продукта и т.п. (См. Выложенную заявку на патент в Японии No. 56-18596 (1981) и международную заявку WO No.95/16042)

С другой стороны, как пример повышения продуктивности штамма продуцента аминокислоты путем увеличения экскреции этой аминокислоты известен штамм, принадлежащий к роду *Corynebacterium*, у которого повышена активность гена экскреции лизина, *lysE*. Однако в отношении бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*, наличие белков, обеспечивающих экскрецию этой аминокислоты, остается неизвестным. Поэтому неизвестно также, может ли повышение активности белка экскреции повысить продукцию аминокислоты в случае бактерий принадлежащих к роду *Escherichia*.

Хотя на сегодня известна нуклеотидная последовательность всей хромосомы штамма *Escherichia coli* K-12, принадлежащего к роду *Escherichia* (*Science*, 227, 1453-1474 (1997)), имеется большое число белков, функция которых остается неизвестной. Среди них могут быть и белки, участвующие в процессе транспорта аминокислот из клеток бактерий.

Задачей настоящего изобретения является выявление белков, участвующих в экскреции L-аминокислот с целью создания штаммов с повышенной продукцией L-аминокислот клетками бактерий и усовершенствование тем самым способа получения L-аминокислот, L-лизина, L-треонин, L-глутамата, L-гистидина, L-пролина, L-аланина, L-аргинина, L-валин или L-изолейцин путем культивирования штаммов-продуцентов

Поставленная задача решается путем выявления генов, контролирующих синтез бактериальных белков, участвующих в экскреции L-аминокислот у *E. coli*, и конструирования на их основе штаммов-продуцентов, позволяющих разработать способ получения аминокислот с повышенным выходом целевой аминокислоты на единицу затраченного углевода.

Предметом настоящего изобретения являются бактерии, принадлежащие к роду *Escherichia*, обладающие способностью к продукции аминокислот, у которых эта способность повышена в результате увеличения экспрессируемого количества, по

крайней мере, одного из белков, принадлежащих к группе состоящей из следующих белков от А по Н) (в дальнейшем рассматриваемые как "бактерии по настоящему изобретению"):

А – белок, который состоит из аминокислотной последовательности № 5 (Фиг. 1 );  
или

В – белок, который состоит из аминокислотной последовательности, включающей также делеции, замены, вставки или добавки из одной или нескольких аминокислот к последовательности №5 и который имеет активность обеспечивающую бактериям, содержащим этот белок, повышенную продукцию L-аминокислот.

С – белок, который состоит из аминокислотной последовательности № 6 (Фиг.2)  
; или

Д – белок, который состоит из аминокислотной последовательности, включающей также делеции, замены, вставки или добавки из одной или нескольких аминокислот к последовательности №6 и который имеет активность обеспечивающую бактериям, содержащим этот белок, повышенную продукцию L-аминокислот.

Е. – белок, который состоит из аминокислотной последовательности № 7 (Фиг.3); или

Ф – белок, который состоит из аминокислотной последовательности, включающей также делеции, замены, вставки или добавки из одной или нескольких аминокислот к последовательности №7 и который имеет активность обеспечивающую бактериям, содержащим этот белок, повышенную продукцию L-аминокислот.

Г – белок, который состоит из аминокислотной последовательности № 8(Фиг.4)  
; или

Н – белок, который состоит из аминокислотной последовательности, включающей также делеции, замены, вставки или добавки из одной или нескольких аминокислот к последовательности №8 и который имеет активность обеспечивающую бактериям, содержащим этот белок, повышенную продукцию L-аминокислот.

Бактериями по настоящему изобретению преимущественно являются продуценты L-лизина, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы, состоящей из белков поименованных в п.от А по D и G и H увеличено; продуценты L-глутаминовой кислоты, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы, состоящей из белков поименованных в п.от А по H увеличено; продуценты L-аланина, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы, состоящей из белков поименованных в п. С и D увеличено; продуценты L-валина, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы, состоящей из белков поименованных в п. С и D увеличено; продуценты L-пролина, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы, состоящей из белков поименованных в п.от С по F увеличено; продуценты L-треонина, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы, состоящей из белков поименованных в п. Е и F увеличено; продуценты L-гистидина, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы, состоящей из белков поименованных в п. С, D, G и H увеличено; продуценты L-аргинина, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы, состоящей из белков поименованных в п. от А по D, и G, H увеличено; продуценты L-изолейцина, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы, состоящей из белков поименованных в п. С и D, увеличено.

В клетках бактерий по настоящем изобретению число копий ДНК, кодирующих указанные белки, увеличено. Указанная ДНК в клетках этих бактерий преимущественно находится на многокопийном векторе или на транспозоне.

Настоящее изобретение также защищает способ получения аминокислот, который включает этапы:

1. культивирования бактерий, полученных в соответствии с настоящим изобретением, и обладающих способностью к продукции аминокислот, в культуральной среде, обеспечивающей продукцию и накопление соответствующей аминокислоты в этой среде, и
2. выделения накопившейся аминокислоты из этой среды.

Этот способ получения аминокислот включает получение L-лизина с помощью бактерий, продуцирующих L-лизин, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы, состоящей из белков поименованных в п.от А по D и G, Н увеличено; получение глутаминовой кислоты с помощью бактерий, продуцирующих глутаминовую кислоту, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы, состоящей из белков поименованных в п.от А по Н увеличено; получения L-треонина с помощью бактерий, продуцирующих L-треонин, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы, состоящей из белков поименованных в п. Е и F увеличено; получение L-аланина с помощью бактерий, продуцирующих L-аланин, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы, состоящей из белков поименованных в п. Си D увеличено; получения L-пролина с помощью бактерий, продуцирующих L-пролин, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы, состоящей из белков поименованных в п.от С по F увеличено; получение L-валина с помощью бактерий, продуцирующих L-валин, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы, состоящей из белков поименованных в п. С и D увеличено; получение L-изолейцина с помощью бактерий, продуцирующих L-изолейцин, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы, состоящей из белков поименованных в п.С и D увеличено; получения L-гистидина с помощью бактерий, продуцирующих L-гистидин, у которых

экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы , состоящей из белков поименованных в п. С, D и G, H увеличено; получения L-пролина помощью бактерий, продуцирующих L-аргинин, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы , состоящей из белков поименованных в п. от A по D и G, H увеличено.

В соответствии с настоящим изобретением способность продуцировать аминокислоты бактериям, принадлежащим к роду *Escherichia*. может быть усилена, а способ получения аминокислот может быть усовершенствован в том , что касается повышения продукции аминокислот.

Ниже следует детальное объяснение настоящего изобретения. В дальнейшем изложении, если не оговорено, имеются в виду L-стереоизомеры аминокислот.

#### 1. Бактерии по настоящему изобретению.

Бактерии по настоящему изобретению представлены бактериями, принадлежащими к роду *Escherichia*, способными к продукции аминокислот, у которых эта способность повышена за счет повышения экспрессируемого количества белков, обладающих активностью, которая обеспечивает увеличенную продукцию аминокислот. В дальнейшем эти белки будут обозначены как «белки, экскретирующие аминокислоты», однако этот термин не означает, что функция указанных белков ограничивается только экскрецией аминокислот. Примером белков, экскретирующих аминокислоты, являются белки, имеющие аминокислотные последовательности, представленные на Фиг.1 (последовательность No.5), Фиг.2 (Последовательность No.6), Фиг.3 (Последовательность No.7) и Фиг.4 (Последовательность No.8). Белки, экскретирующие аминокислоты, могут иметь специфичность по отношению к определенным аминокислотам. Эта специфичность может быть определена путем экспрессии соответствующих белков в клетках бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*, и установления факта повышения минимально ингибирующих



концентраций определенных аминокислот, или аналогов аминокислот. Кроме того, специфичность может быть определена путем экспрессии соответствующих белков в клетках указанных бактерий, обладающих способностью к продукции аминокислот, и установления факта повышения продукции соответствующих аминокислот.

Например, в случае лизина, белок, имеющий последовательность, показанную в списке последовательностей под номером 5, 6 или 8 обнаружил такого рода активность. В случае глутаминовой кислоты белок, имеющий последовательность, показанную в списке последовательностей под номером 5, 6, 7 или 8, обнаруживает такого рода активность. В случае треонина белок, имеющий последовательность, показанную в списке последовательностей под номером 7, обнаруживает такого рода активность. В случае аланина белок, имеющий последовательность, показанную в списке последовательностей под номером 6, обнаруживает такого рода активность. В случае гистидина белок, имеющий последовательность, показанную в списке последовательностей под номером 6 и 8, обнаруживает такого рода активность. В случае пролина белок, имеющий последовательность, показанную в списке последовательностей под номером 6 или 7, обнаруживает такого рода активность. В случае аргинина белок, имеющий последовательность, показанную в списке последовательностей под номером 5, 6 или 8, обнаруживает такого рода активность. В случае валина белок, имеющий последовательность, показанную в списке последовательностей под номером 6, обнаруживает такого рода активность. В случае изолейцина белок, имеющий последовательность, показанную в списке последовательностей под номером 6, обнаруживает такого рода активность. В случае аргинина, белок, имеющий последовательность, показанную в списке последовательностей под номером 5, 6 или 8 обнаружил такого рода активность.

Термин «экспрессируемое количество увеличено» используется здесь для обозначения того факта, что экспрессируемое количество белка больше чем в штаммах

дикого типа, например, в штамме *E. coli* MG1655 или W3110. Этот термин означает также, что если штамм получен путем генетической модификации, например, с помощью методов геной инженерии и т.п., то экспрессируемое количество белка повышается в результате этой модификации. Экспрессируемое количество белка, секретирующего аминокислоту может быть прямо определено путем измерения количества белка, секретирующего аминокислоту, или косвенно по эффекту этого белка на устойчивость бактерий к аминокислотам и к аналогам аминокислот, или на продуктивность бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia* и содержащих этот белок.

Способ повышения экспрессируемого количества белка, секретирующих аминокислоту, может включать методы, предполагающие увеличение числа копий ДНК, кодирующих этот белок. Для увеличения числа копий ДНК фрагмент ДНК, кодирующий указанный белок, лигируют с вектором, который может функционировать в бактериях, принадлежащих к роду *Escherichia*, с образованием рекомбинантной ДНК, которой затем трансформируют клетки бактерии-хозяина. При этом число копий гена, кодирующего белок, секретирующий аминокислоту (гена белка, секретирующего аминокислоту) в клетках трансформированных бактерий увеличивается, и таким образом повышается экспрессируемое количество белка, секретирующего аминокислоту. Для этой цели можно использовать многокопийный вектор.

Кроме того, повышение экспрессируемого количества белка, секретирующего аминокислоту, может быть достигнуто введением множества копий гена белка, секретирующего аминокислоту, в хромосоме бактерии-хозяина. Это введение в хромосому бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*, может быть осуществлено посредством гомологической рекомбинации с использованием в качестве мишеней последовательностей ДНК, множество копий которых существует в хромосоме. В качестве таковых могут быть использованы повторяющиеся последовательности в

хромосомной ДНК и обращенные повторы транспозируемых элементов. Альтернативный метод предполагает введение в хромосомную ДНК множества копий гена белка, секретирующего аминокислоту, с помощью интеграции его в транспозон и последующей индукции множественных актов транспозиции, как это описано в Выложенной заявке на патент в Японии No. 2-109985 (1990). В результате осуществления любого из описанных выше подходов число копий гена, секретирующего аминокислоту, увеличится и тем самым увеличится экспрессируемое количество белка, секретирующего аминокислоту.

Мультикопийные вектора могут представлены плазмидными векторами, такими как pBR322, pMW118, pUC19 или подобными, или фаговыми векторами, такими как  $\lambda$  1059,  $\lambda$  BF 101, M13mp9 или подобными. Транспозоны могут быть представлены фагом Mu, транспозонами Tn10, Tn5 или подобными. Введение ДНК в бактерии, принадлежащие к роду *Escherichia*, может быть осуществлено, например, с помощью метода Моррисона (Methods in Enzymology., 68, 326, 1979) или метода, в котором реципиентные клетки бактерий подвергают воздействию хлористого кальция для увеличения их проницаемости по отношению к ДНК (Mandel and Higa, J. Mol. Biol., 53, 159, 1970) или другими подобными методами.

Кроме упомянутой выше амплификации генов, экспрессируемое количество белка, секретирующего аминокислоту, может быть увеличено также путем замены экспрессирующей регуляторной последовательности, такой как промотор гена белка, секретирующего аминокислоту на более сильный промотор (Выложенная заявка на патент в Японии No.1-215280 (1989)). В качестве сильных промоторов известны  $\text{lac}$  промотор,  $\text{trp}$  промотор,  $\text{tac}$  промотор,  $P_R$  промотор и  $P_L$  промотор фага ламбда и дркие. Замена промотора усиливает экспрессию гена белка, секретирующего аминокислоту, и тем самым увеличивает экспрессируемое количество указанного

белка. Усиление экспрессирующей регуляторной последовательности можно совмещать с увеличением числа копий гена белка, секретирующего аминокислоту.

В бактериях по настоящему изобретению, может быть повышено экспрессируемое количество нескольких белков, секретирующих аминокислоты.

Белки, секретирующие аминокислоты, кодируются известными генами (открытыми рамками считывания, ORF) *yahN*, *yeaS*, *yfiK*, *yggA*, функция которых не известна. Поэтому ДНК, кодирующие белки, секретирующие аминокислоты, могут быть получены путем синтеза праймеров на основе известных последовательностей (например, полной нуклеотидной последовательности хромосомы *Escherichia coli* K-12, (Science, 277, 1453-1474, 1997)) и амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием хромосомной ДНК бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*, в качестве матрицы. Кроме того, нужный фрагмент ДНК может быть отобран с помощью гибридизации из библиотеки генов хромосомной ДНК указанных бактерий путем применения зонда, изготовленного на основе известной последовательности. Альтернативный подход предполагает синтез ДНК гена кодирующего белок, секретирующий аминокислоту, на основе известной последовательности. Нуклеотидные последовательности фрагментов ДНК кодирующих белки *YahN*, *YeaS*, *YfiK*, *YggA*, секретирующие аминокислоты представлены в формуле изобретения (Последовательности 1-4).

Методы выделения хромосомной ДНК, получения библиотеки генов, ДНК-ДНК гибридизации, ПЦР, выделения и трансформации плазмидной ДНК, рестрицирования и лигирования ДНК, выбора нуклеотидов для праймеров, и т.п. методы хорошо известны и детально описаны во многих руководствах, например, Sambrook, J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.).

Белки, экскретирующие аминокислоты, могут содержать делеции, замены, инсерции или добавки одной или нескольких аминокислот в одной или нескольких позициях, не нарушающих при этом активность белка, обеспечивающую повышенную устойчивость к аминокислотам и/или аналогам и повышенную продукцию аминокислот.

Фрагменты ДНК, кодирующие по существу те же белки, что и белки экскретирующие аминокислоты, описанные выше, могут быть получены, например, путем модификации нуклеотидной последовательности, в частности при помощи сайт-направленного мутагенеза, так что один или более аминокислотный остаток будет делетирован, заменен, вставлен или добавлен. ДНК, модифицированная описанным выше способом, может быть получена известными методами с помощью мутационных воздействий. Мутационная обработка включает методы обработки ДНК, кодирующей белок, экскретирующий аминокислоту, *in vitro*, например, при помощи гидроксилamina, или методы обработки микроорганизма, в частности, бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia* и несущих ДНК, кодирующую белок, экскретирующий аминокислоту, УФ облучением или мутагенными агентами, такими как N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (НГ) или азотистая кислота, которые обычно используются для индукции мутаций.

Фрагменты ДНК, кодирующую указанные варианты белков, экскретирующих аминокислоты, отбирают путем экспрессии в клетках бактерий рода *Escherichia* плазмидной ДНК, несущей ген, кодирующий указанный белок, и подвергнутой *in vitro* мутагенному воздействию, как описано выше, в соответствующих клетках с последующим определением их устойчивости к высокой концентрации аминокислоты и/или аналога аминокислоты и/или способности повышать продукцию аминокислоты.

Изобретение относится также к вариантам белков, экскретирующих аминокислоты, которые встречаются в разных видах, штаммах и вариантах бактерий

рода *Escherichia* и обусловлены природным разнообразием. ДНК, кодирующих эти варианты, и которые гибридизуются в жестких условиях с ДНК, имеющими нуклеотидные последовательности с 1 по 4, показанные в формуле изобретения.

Термин «жесткие условия» означает здесь условия, при которых так называемая специфическая гибридизация происходит, а неспецифическая не происходит. Трудно четко выразить эти условия с помощью каких-то цифровых значений, однако например, жесткие условия включают условия, при которых ДНК, имеющие высокую гомологию, например, не менее 70% гомологии по отношению друг к другу - гибридизуются, а ДНК, имеющие гомологию ниже указанной величины - нет.

Среди отобранных таким образом генов могут встречаться гены с появившимся в их средней части стоп-кодоном, или гены, кодирующие белок, который утратил активность в результате мутации в активном центре. Такие дефектные гены легко элиминируются после лигирования их с коммерчески доступными экспрессионными векторами и определения способности повышать продукцию аминокислот бактериями, принадлежащими к роду *Escherichia*, как это описано выше.

Термин «ДНК, кодирующая белок», обозначает двунитевую ДНК, одна из нитей которой кодирует белок.

Увеличив экспрессируемое количество белка, секретирующего аминокислоту, в клетках штамма-продуцента, как это описано выше, можно повысить продукцию соответствующей аминокислоты. При этом возможны два варианта:

1. Признак повышенного экспрессируемого количества белка, секретирующего аминокислоту вводят в штамм, уже способный продуцировать желаемую аминокислоту.
2. Способность к продукции аминокислот придается штаммам, у которых экспрессируемое количество белка, секретирующего аминокислоту, уже повышено.

Примеры бактерий, продуцирующих аминокислоты и принадлежащих к роду *Escherichia*, приведены ниже.

#### Треонин –продуцирующие бактерии

Продуцент треонина, принадлежащий к роду *Escherichia*, может быть представлен штаммом VL2054. Этот штамм является производным известного штамма *E. coli* ВКПМ В-3996 (Патент США No. 5 175 107), и получен на его основе в два этапа. Сначала из штамма *E. coli* ВКПМ В-3996 элиминируют плазмиду pVIC40; в полученный бесплазмидный реципиент с помощью фага P1 трансдуцируют сцепленный с транспозоном Tn10 дикий аллель гена *ghtA*, связанный с устойчивостью к гомосерину и треонину (ABSTRACTS of 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology in conjunction with 1997 Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, San Francisco, California August 24-29, 1997, №457) и получают известным методом мутацию, повреждающую ген *kan* транспозона Tn5, интегрированного в ген *tdh*.

На втором этапе в интегративный вектор миниMu (Mud) клонируют гены треонинового оперона из плазмиды pVIC40 под  $P_R$  промотором фага ламбда и ген *cat* устойчивости к хлорамфениколу. Полученную конструкцию интегрируют известным методом в штамм *E. coli* C600, откуда ее трансдукцией переносят в полученный на первом этапе штамм. Таким образом получают штамм *E. coli* VL2054, который является бесплазмидным продуцентом треонина. Кроме треонина в процессе ферментации штамм *E. coli* VL2054 способен накапливать также небольшие количества аланина, валина и изолейцина.

#### Лизин –продуцирующие бактерии

Продуцент лизина принадлежащий к роду *Escherichia*, может быть представлен штаммом *E. coli* W3110 (*tyrA*) (Европ. Патент 488424), в который введена плазида pCABD2 (Международная заявка WO 95/16042). Штамм W3110 (*tyrA*) был

сконструирован следующим образом. Штамм *E.coli* W3110, который хранится в Национальном Институте Генетики (Япония) высевали на чашку с LB-агаром, содержащим стрептомицин, и отбирали стрептомицин-устойчивый мутант. Этот мутант смешивали со штаммом *E.coli* K-12 ME8424, и подращивали в L-бульоне (состав: 1% бактотрептона, 0.5% дрожжевого экстракта, 0.5% NaCl), при 37°C в течение 15 минут для индукции конъюгации. Штамм *E.coli* K-12 ME8424 имеет следующие генетические характеристики (HfrPO45, thi, relA1, tyr::Tn10, ung-1, nadB) и хранится в Национальном Институте Генетики (Япония). Затем, высевая эту суспензию бактерий на полноценную питательную среду (агаризованный L-бульон, содержащий стрептомицин, тетрациклин и хлорамфеникол), получили штамм *E.coli* W3110 (tyrA). Плазмида pCABD2 может быть получена интеграцией фрагмента, содержащего ген *ddh* и фрагмента, содержащего ген *dapB*, которые амплифицировали из хромосомы *E.coli* W3110 на основе известной последовательности, в плазмиду RSED80. Штамм *E.coli*, несущий плазмиду RSFD80, депозирован в Национальном Институте Биологических Наук и Гуманитарных Технологий Агентства Промышленной Науки и Технологии 28 октября 1993 года под номером FERM P-13936, откуда он передан в международный депозитарий по Будапештскому договору от 1 ноября 1994 года и получил номер хранения FERM BP-4859. Кроме того, в качестве продуцента лизина, принадлежащего к роду *Escherichia*, может быть использован штамм *E. coli* VL614. Этот штамм является производным известного штамма VL613 (Авторское свидетельство СССР No.1354458).

Продуценты глутаминовой кислоты.



В качестве продуцента глутаминовой кислоты может быть представлен штамм *E. coli* AJ12624, который содержит мутацию в генах *SucAB*, кодирующие синтез дегидрогеназы альфа-кетоглутаровой кислоты, а также дополнительных мутаций, повышающих выход и стабильность глутаминовой кислоты (Патент США No.5,378,616).

#### Гистидин –продуцирующие бактерии

В качестве продуцента гистидина, принадлежащего к роду *Escherichia*, может рассматриваться штамм *E. coli* 80, описанный в Патенте РФ No.2119536.

#### Пролин –продуцирующие бактерии

В качестве продуцента пролина принадлежащего к роду *Escherichia*; можно рассматривать штамм *E. coli* VL2151 (W3350 *proB\**  $\Delta$ putAP Tn10), сконструированный на основе известного штамма W3350 путем селекции мутантов, устойчивых к 3,4-дегидро-DL-пролину и последующего введения с помощью трансдукции фагом P1 в полученный таким образом мутант, накапливающий следы пролина, мутации  $\Delta$ putAP, сцепленной с транспозоном Tn10

#### Аргинин –продуцирующие бактерии

В качестве продуцента аргинина, принадлежащего к роду *Escherichia coli*, можно рассматривать штамм *E. coli* VL2141, который получен как мутант известного штамма W3350, устойчивый к канаванину и 5-фторурацилу.

Гены белков, секретирующих аминокислоты, по настоящему изобретению были идентифицированы впервые как это описано ниже.

Ранее авторы настоящего изобретения идентифицировали гены *rhtB* и *rhtC* гены как белков экскреции гомосерина и треонина у *Escherichia coli*. Далее, основываясь на предположении о том, что белки экскреции аминокислот должны иметь какое-то сходство в своей структуре, был осуществлен поиск белков, гомологичных *RhtB*.

Поиск гомологии осуществляли с помощью программы BLAST и PSI-BLAST(Altschul, et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997) в базах данных GenBank CDS translations, PDB, SwissProt, Spupdate и PIR; с помощью программы BLITZ (Sturrock, S. S., and J. F. Collins. MPsch version 1.3. Biocomputing research unit. University of Edinburgh, UK(1993)) осуществлялся поиск в базе данных SWALL и с помощью программы SMART (Ogiwara, I. et al., Protein Sci. 5, 1991-1999 (1996) в базе транслированных генов SWISS-PROT. Из более 60 обнаруженных последовательностей гены *yeaS* (кодирует f212 в последовательности No. AE 000274 в базе данных GenBank), *yahN* (кодирует f223 в последовательности No. AE 000140 в базе данных GenBank), *yfiK* (кодирует o195 в последовательности No. AE 000344 в базе данных GenBank) и *yggA* (кодирует f211 в последовательности No. AE 000375 в базе данных GenBank) из *E. coli* могут иметь функцию, сходную с функцией RhtB. Поскольку функции всех этих генов были неизвестны, эти гены были выделены и клонированы на плазмидных векторах имеющих в клетках *E. coli* разное число копий. Затем определялось влияние повышенного экспрессируемого количества продуктов этих генов на чувствительность клеток бактерий *E. coli* к высоким концентрациям аминокислот и аналогов аминокислот, а также на продукцию аминокислот. В результате была установлена повышенная устойчивость бактерий, содержащих плазмиды с генами *yeaS*, *yfiN*, *yahN* и *yggA*, к определенным аминокислотам и аналогам. Кроме того, была обнаружена повышенная продуктивность штаммов-продуцентов аминокислот, содержащих указанные плазмиды. Установлено также, что в этом отношении гены *yahN*, *yeaS*, *yfiK*, и *yggA* могут обладать как определенной избирательностью, так и проявлять множественный эффект.

Получение аминокислот по настоящему изобретению.

Получение аминокислот с помощью штаммов-продуцентов бактерий, полученных в соответствии с настоящим изобретением, осуществляют

культивированием штаммов- в культуральной среде, обеспечивающей продукцию и накопление соответствующей аминокислоты в этой среде, и выделения накопившейся аминокислоты из этой среды.

К числу аминокислот, которые получают по настоящему изобретению относятся лизина, треонин, глутаминовая кислота, гистидин, аланин, пролин, аргинин, валин и изолейцин.

В соответствии с настоящим изобретением, культивирование бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*, выделение и очистку аминокислоты из культуральной жидкости осуществляют известными методами. Для культивирования используют синтетическую или натуральную среду. Такая среда включает источник углерода, азота, минеральные соли и необходимые добавки в количествах, оптимальных для роста и биосинтеза. В качестве источника углерода используют различные углеводы, такие как глюкоза, сахароза, различные органические кислоты. В зависимости от ассимилирующих способностей можно применять спирты, включая этанол или глицерол. В качестве источника азота используют аммиак, различные соли аммония, такие как сульфат аммония, или другие азотсодержащие соединения, такие как амины, а также природные источники азота, такие как пептон, гидролизат соевых бобов, или гидролизат микробных клеток. В качестве минеральных компонентов используются фосфат калия однозамещенный, сульфат магнезии, хлористый натрий, сульфат железа, сульфат марганца, карбонат кальция. Культивирование преимущественно осуществляют в аэробных условиях, таких как культивирование на мешалке, или с аэрацией и перемешиванием культуры. Температура культивирования - от 30° до 40° C, преимущественно 30-38° C. pH культуры - 5-9, преимущественно 6,5-7,2. pH культуры доводят до желаемых значений с помощью аммония, карбоната кальция, различных кислот, оснований или буферов. Культивирование осуществляют в течение 1-3 дней. После завершения культивирования выделение аминокислоты

осуществляют путем удаления твердых частиц, таких как клетки, из среды с помощью центрифугирования или фильтрации через мембранные фильтры с последующим выделением и очисткой целевой аминокислоты с помощью ионообменника, фракционирования с помощью концентрации и кристаллизации.

Перечень фигур.

Фиг.1. Последовательность белка YahN.

Фиг.2 Последовательность белка YeaS.

Фиг.3. Последовательность белка YahN.

Фиг.4. Последовательность белка YggA.

Настоящее изобретение более конкретно поясняют нижеследующие примеры.

**Пример 1.** Получение фрагментов ДНК yahN, yeaS, yfiK, и yggA, кодирующих синтез белков, секретирующих аминокислоты.

Полная нуклеотидная последовательность хромосомы *Escherichia coli* K-12 известна (Science, 277, 1453-1474, 1997). На ее основе синтезируют праймеры, которые используют для амплификации фрагментов ДНК (генов) yahN, yeaS, yfiK, и yggA, кодирующих синтез белков, секретирующих аминокислоты, с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

(1). В качестве матрицы используют хромосомную ДНК штамма *Escherichia coli* MG1655, которую выделяют по стандартной методике (Sambrook, J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.). Амплификацию проводили в термоциклере TechnePHC2, используя Taq полимеразу (Fermentas); условия реакции подбирают в зависимости от температуры плавления праймеров и размеров амплифицируемого

фрагмента, как это описано в руководствах (PCR protocols. Current methods and applications. White, B.A., ed. Humana Press, Totowa, New Jersey, 1993)

Полученные продукты PCR очищали стандартным способом и рестрицировали как описано ниже.

Для амплификации гена *yahN* используют праймеры:

gtgtggaaccgacgccggat (последовательность, комплементарная последовательности нуклеотидов с 1885 по 1704 в последовательности AE000140, хранящейся в GenBank) и tgtgtgtatggtacggggttcgag (последовательность с 223 по 245 нуклеотида там же).

Полученный продукт ПЦР рестрицируют ферментами PstI, StuI и лигируют с вектором pUC21, обработанным теми же ферментами. В результате получают плазмиду pYAHN.

Для амплификации гена *yeaS* используют праймеры:

ctttgccaatcccgtctccc (последовательность, комплементарная нуклеотидам с 7683 по 7702 в последовательности AE000274 в GenBank; и gccccatgcataacggaaag (последовательность с 5542 по 5561 нуклеотид)

Полученный продукт ПЦР рестрицируют ферментом AvaI и лигируют с вектором pUC19. В результате получают плазмиду pYAHN.

Для амплификации гена *yfiK* используют праймеры:

gaagatctttaggccggataaggcg- (последовательность с 4155 по 4177 в AE000344 GenBank, с добавленными на 5' конце нуклеотидами, образующими сайт для BglII), и tggttttaccattggccgc (последовательность, комплементарная нуклеотидам с 6307 по 6326 в той же последовательности).

Полученный продукт ПЦР рестрицируют ферментами BglII, MunI и лигируют с вектором pUC21. В результате получают плазмиду pYFIK.

Для амплификации гена *uggA* были используют праймеры:

acttctcccgcgagccagttc (последовательность, комплиментарная последовательности нуклеотидов с 9606 по 9626 в AE000375 в GenBank) и

ggcaagcttagcgcctctgtt (последовательность с 8478 по 8498 нуклеотид, там же).

Продукт PCR рестрицируют HindIII и ClaI и лигируют с вектором умеренной копийности pOK12 (Vieira, Messing, Gene, 100, 189-194, 1991). В результате получают плазмиду pYGGA.

Полученными плазмидами трансформируют известный штамм *E. coli* TG1 (Sambrook, J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.) и штаммы *E. coli* – продуценты аминокислот.

(2). В качестве матрицы используют хромосомную ДНК штамма *Escherichia coli* W3110, которую выделяют по стандартной методике как описано выше.

Для амплификации гена *yahN* используют праймеры:

ggcgagctcccagtaaccggaataag (последовательность, комплементарная последовательности нуклеотидов с 1230 по 1247 в AE000140, GenBank с сайтом для рестрицирующего фермента SacI, добавленным на 5' конце) и cgctctagaaggaggaccgc attacgg (последовательность с 429 по 446 нуклеотид с последовательностью для рестриктазы XbaI, добавленной на 5' в конце).

Для амплификации гена *yeaS* используют праймеры:

ggcgagctcagattggtagcatattc (последовательность, комплиментарная последовательности нуклеотидов с 6542 по 6560 в AE000274 в GenBank с сайтом для распознавания рестриктазой SacI, добавленной на 5' конце) и cggtctagaattcagcgaagatcaggg- (последовательность с 5799 по 5816 нуклеотида с сайтом распознавания для рестриктазы XbaI, добавленной на 5' в конце).

Для амплификации гена *yfiK* используют праймеры:

ggcgagctca tgttccgtgt cgggtac (последовательность с 5192 по 5209 нуклеотид в AE000344, GenBank с добавленными на 5' конце нуклеотидами, образующими сайт для распознавания ферментом *SacI*) и

ggctctagat agcaagttac taagcgg (последовательность, комплиментарная последовательности нуклеотидов с 5871 по 5854 нуклеотида с добавленными на 5' конце нуклеотидами, образующими сайт для распознавания рестрицирующим ферментом *XbaI*).

Для амплификации гена *uggA* были используют праймеры:

ctctgaattctctcttattagttttctgattgcc (последовательность, комплиментарная последовательности нуклеотидов с 9236 по 9270 в AE000375, GenBank, с добавленными на 5' конце нуклеотидами, образующими сайт для распознавания рестрицирующим ферментом *EcoRI*) и

cgtgacctgcagcgttctcacagcgcggtagcctttaa (последовательность с 8075 по 8112 нуклеотид с добавленными на 5' конце нуклеотидами, образующими сайт для распознавания рестрицирующим ферментом *PstI*).

Полученные продукты ПЦР очищают как описано выше, рестрицируют ферментами *SacI* и *XbaI* (*EcoRI* и *PstI* для *uggA*) и лигируют с малокопийным вектором pMW118, рестрицированным аналогичными ферментами. Нуклеотидную последовательность полученных вставок определяют с помощью ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems) и автоматическим секвенатором ДНК (PE Applied Biosystems). Плазмиды, в которых нуклеотидная последовательность вставок соответствовала приведенной в GenBank, были отобраны и названы, соответственно:

С геном *yahN*: pMW118::*yahN*

С геном *yeaS*: pMW118::*yeaS*

С геном *yfiK*: pMW118::*yfiK*

С геном *yggA*: pMW118::*yggA*

Полученными плазмидами трансформируют штамм JM109 и различные штаммы-продуценты лизина.

**Пример 2** Влияние фрагментов ДНК *yahN*, *yeaS*, *yfiK*, *yggA* на устойчивость бактерий *E. coli* к некоторым аминокислотам и аналогам аминокислот.

Гомология продуктов генов *yeaS*, *yfhN*, *yahN* и *yggA* с белком RhtB и с лизиновым транспортером LysE, осуществляющим экспорт L-лизина из клеток *Corynebacterium glutamicum* (Vrljić et al., Mol. Microbiol., 22, 815-826, 1996), указывает на аналогичную функцию белков – продуктов указанных генов. Известно, что повышение активности генов, контролирующих транспорт из клеток различных ингибиторов роста, увеличивает их устойчивость к соответствующим соединениям. В связи с этим определяют влияние плазмид, несущих фрагменты ДНК *yeaS*, *yahN*, *yfhN* и *yggA*, на устойчивость бактерий *E. coli* TG1 к некоторым аминокислотам и аналогам аминокислот. С этой целью штамм TG1 трансформируют плазмидами pYEAS, pYAHN, pYFIK, pYGGA и векторами pUC21 и pOK12. Ночные культуры полученных штаммов, выращенные в минимальной среде M9 на качалке (около  $10^9$  клеток/мл) разводят 1:100 и подращивают в течение 5 часов в той же среде. Затем полученные культуры в логарифмической фазе роста разводят и приблизительно по  $10^4$  жизнеспособных клеток наносят на высушенные чашки с агаризованной (2% агара) средой M9, содержащей различные концентрации аминокислот, или аналогов аминокислот. Рост или отсутствие роста определяют через 46-48 часов. Таким образом устанавливают минимальные ингибирующие концентрации (МИК) этих соединений (Табл. 1).



Таблица 1

Соединение	МИК (мкг/мл) для штамма <i>E. coli</i> TG1, несущего плазмиды				
	PUC21	PYFIK	PYAHN	pYEAS	PYGGA
L-Гомосерин	500	<b>1000</b>	500	<b>1000</b>	500
L-Треонин	30000	<b>40000</b>	30000	<b>50000</b>	30000
L-Лизин HCl	5000	5000	<b>7500</b>	<b>10000</b>	<b>15000</b>
L-Глутаминовая кислота (натриевая соль)	50000	<b>60000</b>	<b>60000</b>	<b>120000</b>	50000
L-Гистидин	20000	20000	20000	<b>60000</b>	<b>40000</b>
L-Валин	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
L-Пролин	20000	<b>80000</b>	20000	<b>60000</b>	20000
L-Аргинин	10000	10000	<b>20000</b>	<b>20000</b>	<b>20000</b>
АЭЦ	5	<b>10</b>	5	5	<b>200</b>
АОВ	100	<b>200</b>	100	100	100
$\alpha$ -Аминомасляная кислота	2000	<b>5000</b>	2000	<b>10000</b>	2000
4-аза-DL-лейцин	50	50	50	50	<b>100</b>
3,4-Дегидро-DL-пролин	20	20	20	20	20

Как видно из таблицы 1, амплификация фрагмента ДНК *yfiK* существенно повышает устойчивость бактерий к пролину, в меньшей степени возрастает устойчивость к треонину, гомосерину, глутамату,  $\alpha$ -аминомасляной кислоте, к аналогу треонина,  $\alpha$ -амино- $\beta$ -оксивалериановой кислоте (АОВ) и к аналогу L-лизина, (S)-2-аминоэтил-L-цистеину (АЭЦ). Амплификация фрагмента ДНК *yahN* повышает устойчивость бактерий к лизину, глутамату и аргинину. Амплификация гена *yeaS* существенно повышает устойчивость бактерий к глутамату, гистидину и  $\alpha$ -аминомасляной кислоте, в меньшей степени возрастает устойчивость к треонину, гомосерину, лизину и аргинину. Амплификация гена *yggA* существенно повышает

устойчивость бактерий к (S)-2-аминоэтил-L-цистеину (АЭЦ) и лизину, в меньшей степени возрастает устойчивость к глутамату, гистидину, и к 4-аза-DL-лейцину.

Эти результаты свидетельствуют о том, что каждый из белков, кодируемых указанными фрагментами ДНК обладают специфичностью по отношению к нескольким субстратам (аминокислотам) или может обнаруживать неспецифический эффект в результате амплификации.

**Пример 3.** Влияние фрагментов ДНК *yeaS*, *yahN*, *yfiK* на продукцию глутаминовой кислоты.

В качестве продуцента глутаминовой кислоты используют штамм *E. coli* AJ12624 (Патент США No.5,378,616).

Штамм AJ12624 трансформируют каждой из плазмид *pYAHN*, *pYEAS*, *pYFIK* несущей гены белков, секретирующих аминокислоты, а также вектором *pUC21*. В результате получают штаммы: AJ12624/*pUC21* (ВКПМ В-7728); AJ12624/*pYAHN* (ВКПМ В-7729); AJ12624/*pYEAS* (ВКПМ В-7731); AJ12624/*pYFIK* (ВКПМ В-7730).

Каждый из полученных таким образом штаммов культивируют при 37°C 18 часов в LB бульоне содержащем 100 мг/л ампициллина. Затем по 0.3 мл полученной культуральной жидкости вносят в пробирки 20 x 200 мм с 3 мл ферментационной среды, содержащей 100 мг/л ампициллина и культивируют при 37°C 46 часов на роторной качалке (120 об/мин).

Состав ферментационной среды (г/л):

Глюкоза	80
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	22
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2
NaCl	0.8
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0.8

FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0.02
MnSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0.02
Тиамин HCl	0,0002
Дрожжевой экстракт	1,0
CaCO <sub>3</sub>	30 (добавляют после стерилизации)

После культивирования количество накопленной глутаминовой кислоты, а также оптическую плотность культуральной жидкости при 560 нм измеряют известными методами. Результаты представлены в Табл.2.

Таблица 2.

Штамм	Оптическая плотность	Глутаминовая кислота, г/л
AJ12624/pUC21	15.3	21.9
AJ12624/pYAHN	17.9	27.9
AJ12624/pYEAS	18.3	29.7
AJ12624/pYFIK	16.8	28.4

Как следует из таблицы 2, увеличение экспрессируемого количества каждого из белков YahN, YeaS и YfiK, кодируемых соответствующими генами, локализованными на многокопийных плазмидах, повышает продукцию глутаминовой кислоты штаммом-продуцентом. Наибольший эффект дает ген *yeaS*, амплификация которого повышает продукцию аминокислоты на 35%.

**Пример 4.** Влияние фрагментов ДНК *yeaS*, *yahN*, *yfiK* и *uggA*, на продукцию лизина.

(1). В качестве исходного лизин-продуцирующего штамма используют штамм *E.coli* W3110 (TyrA) (Европейский патент No.488424), в который вводят плазмиду pCABD2 (Международной заявке WO 95/16042) и каждую из плазмид pMW118::*yahN*., pMW118::*yeaS*., pMW118::*yfiK*, несущих гены экскреции аминокислот, а также вектор

pMW118. Так были получены следующие штаммы *E. coli*:

W3110 (tyrA)/pCABD2+pMW118::yahN

W3110 (tyrA)/pCABD2+pMW118::yeaS

W3110 (tyrA)/pCABD2+pMW118::yfiK

W3110 (tyrA)/pCABD2+pMW118.

Продукция лизина этими штаммами определяют культивируя их в ферментационной среде следующего состава:

Глюкоза	40 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	16 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g/l
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01 g/l
MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01
Дрожжевой экстракт	2 g/l
Тирозин	0,1 g/l
CaCO <sub>3</sub>	25 g/l

Глюкоза и сернокислый магний стерилизуется отдельно. CaCO<sub>3</sub> стерилизуется сухим жаром при 180°C в течение 2 часов. pH доводится до 7.0. Антибиотики, ампицилин - 50 мг/л и хлорамфеникол - 25 мг/л, вносят в среду после стерилизации.

Культивирование осуществляют при 37°C в течение 30 часов с аэрацией (ротаторная качалка, 115 об./мин). Результаты представлены в Табл.3

Таблица3

Штамм <i>E. coli</i>	Лизин, г/л	Выход на 1 г. сахара, (%)
W3110 (tyrA)/pCABD2, pMW118	12,2	30,5

W3110(tyrA)/pCABD2 + pMW118::yahN	13,8	34,5
W3110(tyrA)/pCABD2 + pMW118::yeaS	12,7	31,8
W3110(tyrA)/pCABD2 + pMW118::yfiK	12,2	30,5

Как следует из Табл. 3, наибольший эффект на продукцию лизина из исследованных в этом примере генов оказывает ген yahN.

(2). В качестве исходного лизин-продуцирующего штамма используют штамм *E. coli* VL614. Этот штамм является производным известного штамма *E. coli* VL613 (Авторское свидетельство СССР No.1354458). Штамм VL614 получают трансдукцией с помощью фага P1 в исходный штамм VL613 дикого аллеля *rhtA*<sup>+</sup>, сцепленного с транспозоном Tn10. Трансдуктанты отбирают на среде LB с тетрациклином (10 мг/л) и среди них находят клоны, чувствительные на минимальной среде к гомосерину (10 г/л). Полученный таким путем штамм VL614 трансформируют плазмидой pYGGA и вектором pOK12. В результате получают штаммы VL614/pYGGA (ВКПМ В-7719) и VL614/pOK12 (ВКПМ В-7722).

Каждый из полученных штаммов культивируют при 37°C 18 часов в LB бульоне с 50 мг/л канамицина. Затем по 0.3 мл полученной культуральной жидкости внесут в пробирки 20 x 200 мм с 3 мл ферментационной среды, описанной в примере 3, содержащей 50 мг/л канамицина, и культивируют при 34° С 68 часов на роторной качалке. После культивирования количество накопленного в среде лизина и глутаминовой кислоты, а также оптическую плотность культуральной жидкости при 560 нм измеряют известными методами. Результаты представлены в Табл.4.

Таблица 4

Штамм <i>E. coli</i>	OD <sub>560</sub>	Лизин, г/л	Глутамат, (г/л)
VL614/pOK12	14.4	2.6	0,8
VL614/pYGGA	15.7	3.6	2.2

Как видно из Табл.4, амплификация фрагмента ДНК *uggA* на плазмиде pOK12 заметно повышает продукцию лизина. Одновременно с этим повышается накопление в культуральной жидкости и глутаминовой кислоты.

**Пример 5.** Влияние фрагментов ДНК *ueaS* и *uggA* на продукцию L-треонина, L-аланина, L-валина и L-изолейцина.

В качестве продуцента треонина используют штамм *E. coli* VL2054. Этот штамм является производным известного штамма *E. coli* ВКПМ В-3996 (Патент США No. 5 175 107), и получен на его основе в два этапа. Сначала из штамма *E. coli* ВКПМ В-3996 элиминируют плазмиду pVIC40; в полученный бесплазмидный реципиент с помощью фага P1 трансдуцируют сцепленный с транспозоном Tn10 дикий аллель гена *rhtA*, связанный с устойчивостью к гомосерину и треонину (ABSTRACTS of 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology in conjunction with 1997 Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, San Francisco, California August 24-29, 1997, №457) и получают известным методом мутацию, повреждающую ген *kap* транспозона Tn5, интегрированного в ген *tdh*.

На втором этапе в интегративный вектор миниMu (Mud) клонируют гены треонинового оперона из плазмиды pVIC40 под P<sub>R</sub> промотором фага ламбда и ген *cat* устойчивости к хлорамфениколу. Полученную конструкцию интегрируют известным методом в штамм *E. coli* C600, откуда ее трансдукцией переносят в полученный на первом этапе штамм. Таким образом получают штамм *E. coli* VL2054, который является бесплазмидным продуцентом треонина. Кроме треонина в процессе

ферментации штамм *E. coli* VL2054 способен накапливать также небольшие количества аланина, валина и изолейцина.

Штамм *E. coli* VL2054 трансформируют каждой из плазмид pYEAS, pYFIK, а также векторами pUC21. В результате получают штаммы *E. coli* VL2054/pYEAS (ВКПМ В-7707), *E. coli* VL2054/pFIK (ВКПМ В-7712) и *E. coli* VL2054/pUC21 (ВКПМ В-7708).

Каждый из полученных таким образом штаммов культивируют при 37°C 18 часов в LB бульоне со 100 мг/л ампициллина. Затем по 0.3 мл полученной культуральной жидкости вносят в пробирки 20 x 200 мм с 3 мл ферментационной среды, описанной в примере 3, содержащей 100 мг/л ампициллина и культивируют при 37°C 46 часов на роторной качалке. После культивирования количество накопленных в среде L-треонина, L-аланина, L-валина и L-изолейцина, а также оптическую плотность культуральной жидкости при 560 нм измеряют известными методами. Результаты представлены в Табл.5.

Таблица 5

Штамм <i>E. coli</i>	OD <sub>560</sub>	Накопление аминокислоты, г/л			
		L-треонина	L-Аланина	L-Валина	L-Изолейцина
VL2054/pUC21	13,4	5.8	0.4	0,31	0,15
VL2054/pYEAS	10,7	5,2	1.4	0,52	0,45
VL2054/pYFIKk	15.2	8.8	0.5	0.22	0.14

Как показано в Табл.5, штамм *E. coli* VL2054/pYFIK накапливает в культуральной жидкости значительно больше треонина, чем штамм *E. coli* VL2054/pUC21, в котором экспрессируемое количество продукта гена *yfiK* не увеличено. Штамм *E. coli* VL2054/pYEAS накапливает больше L-аланина, L- валина и L-изолейцина чем контрольный штамм *E. coli* VL2054/pUC21.

**Пример 6. Влияние фрагментов ДНК *ueaS* и *uggA* на продукцию гистидина.**

В качестве продуцента гистидина, принадлежащего к роду *Escherichia*, используют штамм *E. coli* 80, описанный в Патенте РФ No.2119536. Этот штамм трансформируют плазмидами pYEAS и pYGGA, а также вектором pUC21. В результате получают штаммы: *E. coli* 80/pYEAS (ВКПМ В-7726), *E. coli* 80/pYGGA (ВКПМ В-7725), *E. coli* 80/pUC21 (ВКПМ В-7727).

Каждый из полученных штаммов культивируют при 29 С в течение 20 часов на круговой качалке в посевной среде следующего состава (г/л):

Глюкоза	56
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	28
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.25
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1.125
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0.01
MnSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0.01
Тиамин HCl	0,001
Дрожжевой экстракт	2.8
L-Пролин	0.3
Стрептомицин	1.0

Выращенный материал в количестве вносят в ферментационную среду следующего состава (г/л):

Глюкоза	72
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	28
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.25
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1.125
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0.01
MnSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0.01



Тиамин HCl 0,001

Дрожжевой экстракт 2.8

L-Пролин 1.0

Стрептомицин 1.0

CaCO<sub>3</sub> 65

Глюкозу и мел стерилизуют отдельно.

В стерильную среду вносят 100 мг/мл ампицилина. Культивирование осуществляют в пробирках 20 x 200 мм, при 29 С 68 часов на роторной качалке.

Результаты представлены в Табл.6.

Таблица 6

Штамм	Оптическая плотность	Гистидин, г/л
E. coli 80/pUC19	14.4	13.9
E. coli 80/pYEAS	14.0	15.5
E. coli 80/pYGGA	13.6	14.4

Как следует из Табл.6, штаммы E. coli 80/pYEAS и E. coli 80/pYGGA продуцируют больше гистидина, чем штаммы E. coli 80/pUC21, у которого экспрессируемое количество белков, продуктов генов *ueaS* и *uggA*, не увеличено. При этом видно, что наибольший положительный эффект на продукцию гистидина дает амплификация на плазмиде гена *ueaS*.

#### Пример 7. Влияние фрагментов ДНК *ufiK* и *ueaS* на продукцию пролина

В качестве продуцента пролина, принадлежащего к роду *Escherichia*, используют штамм VL2151 (E. coli W3350 *proB*\*  $\Delta$ *putAP* Tn10), сконструированный на основе известного штамма W3350 путем селекции мутантов, устойчивых к 3,4-дегидро-DL-пролину и последующего введения с помощью трансдукции фагом P1 в полученный

таким образом мутант, накапливающий следы пролина, мутации  $\Delta putAP$ , сцепленной с транспозоном Tn10.

Штамм *E. coli* VL2151 трансформируют каждой из плазмид pYEAS, pYFIK, а также векторами pUC21. В результате получают штаммы *E. coli* VL2151/pYEAS (ВКПМ В-7714), *E. coli* VL2151/pFIK (ВКПМ В-7713) и *E. coli* VL2151/pUC21 (ВКПМ В-7715).

Каждый из полученных таким образом штаммов культивируют при 37°C 18 часов в LB бульоне со 100 мг/л ампициллина. Затем по 0.3 мл полученной культуральной жидкости вносят в пробирки 20 x 200 мм с 3 мл ферментационной среды, описанной в примере 3, содержащей 100 мг/л ампициллина и культивируют при 37C 46 часов на роторной качалке. После культивирования количество накопленного в среде пролина, а также оптическую плотность культуральной жидкости при 560 нм измеряют известными методами. Результаты представлены в табл.7.

Таблица 7

Штамм <i>E. coli</i>	OD <sub>560</sub>	Пролин, г/л
VL2151/pUC21	16.8	0.9
VL2151/pYEAS	17.3	1.5
VL2151/pYFIK	18.0	2.4

Как видно из Табл.7, штаммы *E. coli* VL2151/pYEAS и *E. coli* VL2151/pYFIK накапливают больше пролина, чем штаммы *E. coli* VL2151/pUC21, у которого экспрессируемое количество белков, продуктов генов *ueaS* и *yfiK*, не увеличено. При этом видно, что наибольший положительный эффект на продукцию пролина оказывает гена *yfiK*.

**Пример 8.** Влияние фрагментов ДНК *yahN*, *yfiK* и *yggA* на продукцию аргинина

В качестве продуцента аргинина, принадлежащего к роду *Escherichia coli*, используют штамм *E. coli* VL2141, который получен как мутант известного штамма W3350, устойчивый к канаванину и 5-фторурацилу.

Штамм *E. coli* VL2141 трансформируют каждой из плазмид *pYAHN*, *pYEAS*, *pYGGA*, а также вектором *pUC21*. В результате получают штаммы *E. coli* VL2141/*pYAHN*, *E. coli* VL2141/*pYEAS*, *E. coli*/*pYGGA* и *E. coli* VL2141/*pUC21*.

Каждый из полученных таким образом штаммов культивируют при 37°C 18 часов в LB бульоне со 100 мг/л ампициллина. Затем по 0.3 мл полученной культуральной жидкости внесят в пробирки 20 x 200 мм с 3 мл ферментационной среды, описанной в примере 3, содержащей 100 мг/л ампициллина и культивируют при 37°C 46 часов на роторной качалке. После культивирования количество накопленного в среде аргинина, а также оптическую плотность культуральной жидкости при 560 нм измеряют известными методами. Результаты представлены в табл.8.

Таблица 8

Штамм <i>E. coli</i>	OD <sub>560</sub>	Аргинин, г/л
VL2141/ <i>pUC21</i>	18.4	0.28
VL2141/ <i>pYAHN</i>	19.9	0.45
VL2141/ <i>pYEAS</i>	19.0	0.43
VL2141/ <i>pYGGA</i>	17.8	0.50

Как видно из табл.8, штаммы *E. coli* VL2141/*pYAHN*, *E. coli* VL2141/*pYEAS*, *E. coli*/*pYGGA* накапливают больше аргинина, чем штамм *E. coli* VL2141/*pUC21* у которого экспрессируемое количество белков, продуктов генов *yahN*, *yeaS* и *yggA*, не увеличено.

# Формула изобретения.

1. Фрагмент ДНК уahN, определяющий повышенную устойчивость бактерий *Escherichia coli* к аминокислотам или их аналогам и имеющий следующую нуклеотидную последовательность (последовательность №1):

atg atg cag tta gtt cac tta ttt atg gat gaa atc act atg gat cct	48
Met Met Gln Leu Val His Leu Phe Met Asp Glu Ile Thr Met Asp Pro	
1 5 10 15	
ttg cat gcc gtt tac ctg acc gta gga ctg ttc gtg att act ttt ttt	96
Leu His Ala Val Tyr Leu Thr Val Gly Leu Phe Val Ile Thr Phe Phe	
20 25 30	
aat ccg gga gcc aat ctc ttt gtg gta gta caa acc agc ctg gct tcc	144
Asn Pro Gly Ala Asn Leu Phe Val Val Val Gln Thr Ser Leu Ala Ser	
35 40 45	
ggt cga cgc gca ggg gtg ctg acc ggg ctg ggc gtg gcg ctg ggc gat	192
Gly Arg Arg Ala Gly Val Leu Thr Gly Leu Gly Val Ala Leu Gly Asp	
50 55 60	
gca ttt tat tcc ggg ttg ggt ttg ttt ggt ctt gca acg cta att acg	240
Ala Phe Tyr Ser Gly Leu Gly Leu Phe Gly Leu Ala Thr Leu Ile Thr	
65 70 75 80	
cag tgt gag gag att ttt tcg ctt atc aga atc gtc ggc ggc gct tat	288
Gln Cys Glu Glu Ile Phe Ser Leu Ile Arg Ile Val Gly Gly Ala Tyr	
85 90 95	
ctc tta tgg ttt gcg tgg tgc agc atg cgc cgc cag tca aca ccg caa	336
Leu Leu Trp Phe Ala Trp Cys Ser Met Arg Arg Gln Ser Thr Pro Gln	
100 105 110	
atg agc aca cta caa caa ccg att agc gcc ccc tgg tat gtc ttt ttt	384
Met Ser Thr Leu Gln Gln Pro Ile Ser Ala Pro Trp Tyr Val Phe Phe	
115 120 125	
cgc cgc gga tta att acc gat ctc tct aac ccg caa acc gtt tta ttt	432
Arg Arg Gly Leu Ile Thr Asp Leu Ser Asn Pro Gln Thr Val Leu Phe	
130 135 140	
ttt atc agt att ttc tcagta aca tta aat gcc gaa aca cca aca tgg	480
Phe Ile Ser Ile Phe Ser Val Thr Leu Asn Ala Glu Thr Pro Thr Trp	
145 150 155 160	
gca cgt tta atg gcc tgg gcg ggg att gtg ctc gca tca att atc tgg	528
Ala Arg Leu Met Ala Trp Ala Gly Ile Val Leu Ala Ser Ile Ile Trp	
165 170 175	
cga gtt ttt ctt agt cag gcg ttt tct ttg ccc gct gtg cgt cgt gct	576
Arg Val Phe Leu Ser Gln Ala Phe Ser Leu Pro Ala Val Arg Arg Ala	
180 185 190	
tat ggg cgt atg caa cgc gtt gcc agt cgg gtt att ggt gca att att	624
Tyr Gly Arg Met Gln Arg Val Ala Ser Arg Val Ile Gly Ala Ile Ile	
195 200 205	
ggt gta ttc gcg cta cgc ctg att tac gaa ggg gtg acg cag cgg tga	672
Gly Val Phe Ala Leu Arg Leu Ile Tyr Glu Gly Val Thr Gln Arg	
210 215 220	

2. Фрагмент ДНК *yeaS*, определяющий повышенную устойчивость бактерий *Escherichia coli* к аминокислотам или их аналогам и имеющий следующую нуклеотидную последовательность (последовательность №2):

gtg ttc gct gaa tac ggg gtt ctg aat tac tgg acc tat ctg gtt ggg	48
Met Phe Ala Glu Tyr Gly Val Leu Asn Tyr Trp Thr Tyr Leu Val Gly	
1 5 10 15	
gcc att ttt att gtg ttg gtg cca ggg cca aat acc ctg ttt gta ctc	96
Ala Ile Phe Ile Val Leu Val Pro Gly Pro Asn Thr Leu Phe Val Leu	
20 25 30	
aaa aat agc gtc agt agc ggt atg aaa ggc ggt tat ctt gcg gcc tgc	144
Lys Asn Ser Val Ser Ser Gly Met Lys Gly Gly Tyr Leu Ala Ala Cys	
35 40 45	
ggg gta ttt att ggc gat gcg gta ttg atg ttt ctg gca tgg gct gga	192
Gly Val Phe Ile Gly Asp Ala Val Leu Met Phe Leu Ala Trp Ala Gly	
50 55 60	
gtg gcg aca tta att aag acc acc ccg ata tta ttc aac att gta cgt	240
Val Ala Thr Leu Ile Lys Thr Thr Pro Ile Leu Phe Asn Ile Val Arg	
65 70 75 80	
tat ctt ggt gcg ttt tat ttg ctc tat ctg ggg agt aaa att ctt tac	288
Tyr Leu Gly Ala Phe Tyr Leu Leu Tyr Leu Gly Ser Lys Ile Leu Tyr	
85 90 95	
gcg acc ctg aag ggt aaa aat agc gag gcc aaa tcc gat gag ccc caa	336
Ala Thr Leu Lys Gly Lys Asn Ser Glu Ala Lys Ser Asp Glu Pro Gln	
100 105 110	
tac ggt gct att ttt aaa cgc gcg tta att ttg agc ctg act aat ccg	384
Tyr Gly Ala Ile Phe Lys Arg Ala Leu Ile Leu Ser Leu Thr Asn Pro	
115 120 125	
aaa gcc att ttg ttc tat gtg tcg ttt ttc gta cag ttt atc gat gtt	432
Lys Ala Ile Leu Phe Tyr Val Ser Phe Phe Val Gln Phe Ile Asp Val	
130 135 140	
aat gcc cca cat acg gga att tca ttc ttt att ctg gcg gcg acg ctg	480
Asn Ala Pro His Thr Gly Ile Ser Phe Phe Ile Leu Ala Ala Thr Leu	
145 150 155 160	
gaa ctg gtg agt ttc tgc tat ttg agc ttc ctg att ata tct ggt gct	528
Glu Leu Val Ser Phe Cys Tyr Leu Ser Phe Leu Ile Ile Ser Gly Ala	
165 170 175	
ttt gtc acg cag tac ata cgt acc aaa aag aaa ctg gct aaa gtt ggc	576
Phe Val Thr Gln Tyr Ile Arg Thr Lys Lys Lys Leu Ala Lys Val Gly	
180 185 190	
aac tca ctg att ggt ttg atg ttc gtg ggt ttc gct gcc cga ctg gcg	624
Asn Ser Leu Ile Gly Leu Met Phe Val Gly Phe Ala Ala Arg Leu Ala	
195 200 205	
acg ctg caa tcc tga	639
Thr Leu Gln Ser	
210	

3. Фрагмент ДНК уfiK, определяющий повышенную устойчивость бактерий *Escherichia coli* к аминокислотам или их аналогам и имеющий следующую нуклеотидную последовательность (последовательность №3):

[illegible]



5. Способ получения L-аминокислот путем культивирования штаммов-продуцентов бактерий рода *Escherichia* в подходящей питательной среде с последующим выделением и очисткой целевой аминокислоты, отличающийся тем, что в качестве продуцентов используют бактерии *E. coli*, содержащие фрагмент ДНК по п. 1, или по п. 2, или по п. 3, или по п. 4.



**Фрагменты ДНК, определяющие повышенную  
устойчивость бактерий *Escherichia coli* к  
аминокислотам или их аналогам, и способ  
получения L-аминокислот**

Met	Met	Gln	Leu	Val	His	Leu	Phe	Met	Asp	Glu	Ile	Thr	Met	Asp	Pro
1				5				10					15		
Leu	His	Ala	Val	Tyr	Leu	Thr	Val	Gly	Leu	Phe	Val	Ile	Thr	Phe	Phe
		20						25					30		
Asn	Pro	Gly	Ala	Asn	Leu	Phe	Val	Val	Val	Gln	Thr	Ser	Leu	Ala	Ser
		35					40					45			
Gly	Arg	Arg	Ala	Gly	Val	Leu	Thr	Gly	Leu	Gly	Val	Ala	Leu	Gly	Asp
	50					55				60					
Ala	Phe	Tyr	Ser	Gly	Leu	Gly	Leu	Phe	Gly	Leu	Ala	Thr	Leu	Ile	Thr
65					70				75					80	
Gln	Cys	Glu	Glu	Ile	Phe	Ser	Leu	Ile	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Ala	Tyr
			85					90						95	
Leu	Leu	Trp	Phe	Ala	Trp	Cys	Ser	Met	Arg	Arg	Gln	Ser	Thr	Pro	Gln
		100						105					110		
Met	Ser	Thr	Leu	Gln	Gln	Pro	Ile	Ser	Ala	Pro	Trp	Tyr	Val	Phe	Phe
	115						120					125			
Arg	Arg	Gly	Leu	Ile	Thr	Asp	Leu	Ser	Asn	Pro	Gln	Thr	Val	Leu	Phe
	130				135						140				
Phe	Ile	Ser	Ile	Phe	Ser	Val	Thr	Leu	Asn	Ala	Glu	Thr	Pro	Thr	Trp
145				150					155					160	
Ala	Arg	Leu	Met	Ala	Trp	Ala	Gly	Ile	Val	Leu	Ala	Ser	Ile	Ile	Trp
			165					170					175		
Arg	Val	Phe	Leu	Ser	Gln	Ala	Phe	Ser	Leu	Pro	Ala	Val	Arg	Arg	Ala
		180						185					190		
Tyr	Gly	Arg	Met	Gln	Arg	Val	Ala	Ser	Arg	Val	Ile	Gly	Ala	Ile	Ile
	195					200					205				
Gly	Val	Phe	Ala	Leu	Arg	Leu	Ile	Tyr	Glu	Gly	Val	Thr	Gln	Arg	
	210					215					220				

**Фиг. 1. Последовательность № 5**

[illegible]

**Фиг. 2. Последовательность № 6**

**Фрагменты ДНК, определяющие повышенную  
устойчивость бактерий *Escherichia coli* к  
аминокислотам или их аналогам, и способ  
получения L-аминокислот**

Met	Thr	Pro	Thr	Leu	Leu	Ser	Ala	Phe	Trp	Thr	Tyr	Thr	Leu	Ile	Thr
1				5					10					15	
Ala	Met	Thr	Pro	Gly	Pro	Asn	Asn	Ile	Leu	Ala	Leu	Ser	Ser	Ala	Thr
			20					25					30		
Ser	His	Gly	Phe	Arg	Gln	Ser	Thr	Arg	Val	Leu	Ala	Gly	Met	Ser	Leu
		35					40					45			
Gly	Phe	Leu	Ile	Val	Met	Leu	Leu	Cys	Ala	Gly	Ile	Ser	Phe	Ser	Leu
	50					55					60				
Ala	Val	Ile	Asp	Pro	Ala	Ala	Val	His	Leu	Leu	Ser	Trp	Ala	Gly	Ala
65					70					75					80
Ala	Tyr	Ile	Val	Trp	Leu	Ala	Trp	Lys	Ile	Ala	Thr	Ser	Pro	Thr	Lys
			85					90						95	
Glu	Asp	Gly	Leu	Gln	Ala	Lys	Pro	Ile	Ser	Phe	Trp	Ala	Ser	Phe	Ala
		100						105					110		
Leu	Gln	Phe	Val	Asn	Val	Lys	Ile	Ile	Leu	Tyr	Gly	Val	Thr	Ala	Leu
	115						120					125			
Ser	Thr	Phe	Val	Leu	Pro	Gln	Thr	Gln	Ala	Leu	Ser	Trp	Val	Val	Gly
	130					135					140				
Val	Ser	Val	Leu	Leu	Ala	Met	Ile	Gly	Thr	Phe	Gly	Asn	Val	Cys	Trp
145					150					155					160
Ala	Leu	Ala	Gly	His	Leu	Phe	Gln	Arg	Leu	Phe	Arg	Gln	Tyr	Gly	Arg
			165					170					175		
Gln	Leu	Asn	Ile	Val	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Val	Tyr	Cys	Ala	Val	Arg
		180						185					190		
Ile	Phe	Tyr													
	195														

**Фиг. 3. Последовательность № 7**

**Фрагменты ДНК, определяющие повышенную  
устойчивость бактерий *Escherichia coli* к  
аминокислотам или их аналогам, и способ  
получения L-аминокислот**

Met	Phe	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Gly	Ala	Ala	Met	Ile
1				5				10						15	
Leu	Pro	Leu	Gly	Pro	Gln	Asn	Ala	Phe	Val	Met	Asn	Gln	Gly	Ile	Arg
		20						25					30		
Arg	Gln	Tyr	His	Ile	Met	Ile	Ala	Leu	Leu	Cys	Ala	Ile	Ser	Asp	Leu
		35					40					45			
Val	Leu	Ile	Cys	Ala	Gly	Ile	Phe	Gly	Gly	Ser	Ala	Leu	Leu	Met	Gln
	50					55					60				
Ser	Pro	Trp	Leu	Leu	Ala	Leu	Val	Thr	Trp	Gly	Gly	Val	Ala	Phe	Leu
65					70					75					80
Leu	Trp	Tyr	Gly	Phe	Gly	Ala	Phe	Lys	Thr	Ala	Met	Ser	Ser	Asn	Ile
				85					90					95	
Glu	Leu	Ala	Ser	Ala	Glu	Val	Met	Lys	Gln	Gly	Arg	Trp	Lys	Ile	Ile
			100					105					110		
Ala	Thr	Met	Leu	Ala	Val	Thr	Trp	Leu	Asn	Pro	His	Val	Tyr	Leu	Asp
		115					120					125			
Thr	Phe	Val	Val	Leu	Gly	Ser	Leu	Gly	Gly	Gln	Leu	Asp	Val	Glu	Pro
		130				135					140				
Lys	Arg	Trp	Phe	Ala	Leu	Gly	Thr	Ile	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Trp	Phe
145					150					155					160
Phe	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ala	Ala	Trp	Leu	Ala	Pro	Arg	Leu	Arg	Thr
				165				170					175		
Ala	Lys	Ala	Gln	Arg	Ile	Ile	Asn	Leu	Val	Val	Gly	Cys	Val	Met	Trp
			180					185					190		
Phe	Ile	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Arg	Asp	Gly	Ile	Ala	His	Ala	Gln	Ala
		195					200					205			
Leu	Phe	Ser													
210															

**Фиг. 4. Последовательность № 8**

## РЕФЕРАТ

### ФРАГМЕНТЫ ДНК, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ПОВЫШЕННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* К АМИНОКИСЛОТАМ ИЛИ ИХ АНАЛОГАМ, И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ L-АМИНОКИСЛОТ

Изобретение относится к биотехнологии и генетической инженерии. Заявлены фрагменты ДНК *yahN*, *yeaS*, *yfiK*, *yggA*, кодирующие синтез белков, придающих бактериям *Escherichia coli* повышенную устойчивость к аминокислотам или их аналогам. На основе этих фрагментов сконструированы штаммы бактерий *E. coli*, обладающие повышенной способностью к продукции L-лизина, L-треонина, L-глутаминовой кислоты, L-гистидина, L-пролина, L-аланина, L-аргинина, L-валина и L-изолейцина. Описан способ получения аминокислот с использованием новых штаммов-продуцентов.